1. Sinonímia

VIDAS HIV DUO

2. Aplicabilidade

Aos bioquímicos do setor de imunologia.

3. Aplicação clínica

O vírus da imunodeficiência humana (HIV) é um retrovírus RNA, transmitido por via sexual, parenteral, perinatal e transplacentária. Após o isolamento do HIV-1 (1983) e HIV-2 (1985) já foram caracterizadas numerosas variantes genéticas para este vírus.
O diagnóstico do HIV baseia-se, em prática, pela detecção de anticorpos séricos anti HIV, pela detecção de Antígeno p24. O teste HIV DUO é um avanço, pois faz detecção combinada de antígeno p24 do HIV-1 e das imunoglobulinas totais anti HIV-1 e anti HIV-2. Estudos recentes demonstraram que, durante o período da janela imunológica, 3 semanas (em média) entre a contaminação e o aparecimento dos primeiros anticorpos o antígeno p24 do HIV-1 estava presente na maioria dos paciente infectados por HIV-1. Assim, a detecção combinada do antígeno p24 e dos anticorpos anti HIV-1 e anti HIV-2 permite diagnóstico precoce reduzindo o intervalo de tempo entre a contaminação e o diagnóstico da infecção.

4. Princípio do teste

Ocorre associação de duas reações imunoenzimáticas com duas detecções finais em fluorescência (ELFA). O cone de utilização única serve de fase sólida e sistema de pipetagem. Os reagentes no barrete estão prontos para uso. Todas as etapas do teste são efetuadas, automaticamente, no equipamento.
A parte superior do cone permite a detecção do Ag p24 devido a sensibilização deste nesta região com anticorpos monoclonais anti p24. A parte inferior do cone permite a detecção dos Ac anti HIV-1 e anti HIV-2 devido a sensibilização do cone nesta região por uma proteína gp160 de HIV-1 e por peptídeos de síntese específicos do HIV-1 grupo O e do HIV-2.
Primeira incubação: amostra e Ac de coelho anti p24 biotinilado presentes no barrete são aspirados e dispensados no cone, o vírus então é lisado e os Ags p24 liberados vão ligar-se aos Ac monoclonais anti p24 fixados na parte superior do cone e são reconhecidos pelos Acs anti p24 biotinilados dispensados do barrete. Simultaneamente os Acs anti HIV-1 e/ou anti HIV-2 fixam-se à gp160 e/ou aos peptídeos da parte inferior do cone. Dois ciclos de lavagens eliminam componentes não fixados.
Segunda incubação: Ags biotinilados presentes no barrete fixam-se aos Ac anti HIV presentes na parte inferior do cone. Lavagens eliminam reagentes em excesso.

Terceira incubação: a estreptavidina marcada com fosfatase alcalina fixa-se aos Acs anti p24 biotinilados, se estes existirem, na parte superior do cone, e aos Ags biotinilados, se estes existirem na parte inferior do cone. Lavagens eliminam reagentes em excesso.
O substrato (4-Metil- umbeliferil-fosfato) é incubado na parte inferior do cone e feita a primeira leitura de fluorescência (450nm) onde a intensidade da fluorescência é proporcional à concentração de anticorpos anti HIV.
Em seguida o substrato (4-Metil- umbeliferil-fosfato) é incubado na totalidade do cone e é feita a segunda leitura de fluorescência. O equipamento calcula a intensidade de fluorescência ligada à parte superior do cone proporcional à concentração de Ag p24 do HIV-1 presente na amostra.
Terminado o teste, os resultados são calculados automaticamente em relação aos calibradores e impressos.

5. Amostra

5.1 Preparo do paciente
Jejum não necessário.
5.2 Tipo de amostra
Soro ou plasma (heparina ou EDTA). Soros inativados a 56^{o}C por 30 minutos não podem ser utilizados. Amostras inadequadas: lipêmicas, hemolisadas, ictéricas ou mal identificadas.
5.3 Colheita
Observar as precauções universais para punção venosa.
Quantidade mínima de sangue: 1 ml
Quantidade ideal de sangue: 3 ml
5.4 Preservação e transporte
As amostras são estáveis por 2 dias refrigeradas a 2-8^{0}C. Para o transporte observar as normas de segurança legais.
5.5 Identificação da amostra
Etiqueta com código de barras gerada pelo sistema de gerenciamento de dados do LAC.
5.6 Armazenamento
Para o armazenamento por períodos superiores a 2 dias congelar a –25^{0}C $\pm$ 6^{0}C.

6. Reagentes e materiais

Reagentes do kit
Cones: cones sensibilizados na parte inferior com proteína gp160 e peptídeos de síntese específicos (Ag) do HIV-1 grupo O e HIV-2 e na parte superior por anticorpos monoclonais anti p24. Cada cone está identificado pelo código HIV5.
Barretes: Possuem etiqueta de código de barras com informações do teste. Descrição dos poços e respectivos reagentes: 1ºpoço colocar a amostra. 2ºpoço possui tampão HEPES, Ac

anti p24 marcado com biotina e estabilizantes. 3°, 5º, 6º, 8º e 9º poço possuem tampão TRIS e estabilizantes. 4ºpoço possui tampão HEPES, proteína gp160 e peptídeos de síntese marcados com biotina (Ag) e estabilizantes. 7ºpoço possui a estreptavidina marcada com fosfatase alcalina , tampão TRIS e estabilizantes. 10ºpoço cubeta de leitura com substrato 4-metil-umbeliferil fosfato, dietanolamina e azida sódica.
Controles:
Controle Positivo (C1) soro humano contendo anticorpos anti HIV-1 com nível de concentração conhecida, tampão TRIS, estabilizantes e conservantes.
Controle Negativo (C2) soro humano negativo, tampão TRIS, estabilizantes e conservantes.Pronto para uso.
Controle Positivo (C3) soro humano contendo lisado viral HIV-1 inativado com nível de concentração conhecida, tampão TRIS, estabilizantes e conservantes.
Calibrador (S1) soro humano contendo anticorpos anti HIV-1 com nível de concentração conhecida, tampão TRIS, estabilizantes e conservantes.
Calibrador (S2) soro humano, tampão TRIS, lisado viral HIV-1, estabilizantes e conservantes.
Cartão MLE: ficha de especificações que possui os dados necessários a calibração do teste.

6.1 Preparo

Verificar na bula como preparar calibradores e controles.

6.2 Estabilidade

Estáveis até a data de vencimento.

6.3 Armazenamento

Em refrigerador a 2-8°C

7. Equipamentos

MINAS-VIDAS, Centrífuga e pipetas automáticas.

8. Calibração

Procedimento:
Leitura automática da Curva Master (Cartão MLE):
A partir do “Menu Principal” selecionar a opção “Menu de Calibração” e “Ler curva de Calibração”.
Colocar o cartão MLE na bandeja própria e inserir no equipamento, selecionar a seção na qual o mesmo foi inserido (A ou B) e a leitura será feita automaticamente. Ao terminar, o equipamento retornará ao “Menu de Calibração”.

Caso a leitura automática do cartão MLE não seja possível, selecionar a opção "Introdução Manual da Curva de Calibração", digitar todos os números e letras contidas nas posições 1 a 16 do cartão e teclar "enter" após cada informação.
Após a leitura do cartão para solicitar a calibração selecionar "Menu Principal", "Inicialização com Identificação", o segmento a ser utilizado A, colocar os barretes e cones nas posições de 1 a 6 e digitar:
Nº1, a letra S , 1 novamente e "Enter";
Nº2 letra S, 1 "Enter";
Nº3 letra S, 2 "Enter";
Nº4 letra S, 2 "Enter";
Nº5 letra C, 1 "Enter";
Nº6 letra C, 2 "Enter";
Posteriormente selecionar no "Menu Principal", "Inicialização com Identificação", o segmento a ser utilizado B, colocar barrete e cone na posição 1 e digitar Nº1, a letra C, 3 e "Enter". Homogenizar em vórtex os calibradores e controles para melhor reprodutibilidade.
Voltar a tela anterior, pipetar 200µl dos calibradores e controles nas respectivas posições selecionadas e teclar "Inicialização". Ao final, os resultados são impressos automaticamente. Os valores expressos devem ficar dentro da faixa aceitável definida no cartão MLE.
Este procedimento é realizado na troca de lote e sempre que houver rotina após o vencimento da calibração (14 dias).

9. Procedimento (passo a passo)

Retirar da geladeira os reagentes necessários e deixar a temperatura ambiente antes do uso. Retornar o kit à geladeira e manter bem fechado a embalagem dos cones.
Programar os testes no Menu Principal selecionar "Inicialização com Identificação" e o segmento utilizado A/B. Identificar as amostras nas posições 1-6 usando o teclado alfa-numérico e "Enter" após cada dado introduzido ou ainda utilizar o scanner de leitor de código de barras para a identificação.
Colocar no equipamento os cones e barretes.
Homogeneizar bem as amostras e pipetar 200µl no poço-amostra respectivo.
Voltar à tela anterior e teclar "Inicialização".
Ao término do ensaio os resultados serão impressos automaticamente
Para maiores detalhes consultar o Manual de Utilização MINI-VIDAS.

10. Controle de Qualidade

10.1 Interno

Controles Positivo e Negativo fornecidos pelo kit: utilizados a cada troca de lote e na rotina após 14 dias da corrida do último controle. Registrar os resultados na planilha de controles;
Valores não aceitáveis:

- repetir os controles;
- novamente fora do esperado proceder recalibração do kit e repetir os controles;
- novamente fora, descartar o kit e/ou controles.

10.2 Externo
Vide tabela PCIQ/PAEQ.

11. Resultados

11.1 Unidades
Os resultados são expressos em índice.
11.2Cálculos
O equipamento efetua várias medidas de fluorescência na cubeta de leitura para cada teste. A primeira leitura corresponde ao branco, a segunda é efetuada para detecção dos anticorpos anti HIV após incubação do substrato com a enzima presente na parte inferior do cone, a terceira é efetuada para detecção dos antígenos p24 de HIV-1 após incubação do substrato com a enzima presente na totalidade do cone. O cálculo do RFV (Relative Fluorescence Value) realizado automaticamente pelo equipamento é o resultado da diferença entre branco e cada uma das outras medidas. Após, é calculado automaticamente, para cada teste um índice (resultado) obtido pela relação entre o RFV e o calibrador específico.
11.3 Critérios de aceitação
Os controles devem apresentar valores aceitáveis para a liberação dos demais resultados conforme range próprio estabelecido a cada lote de reagente. Se o valor dos controles se afastar dos valores esperados, os resultados não podem ser validados.

12. Valores de referência

Negativo <0,25.
Positivo > ou igual a 0,25.
ND: Não determinado.Esta mensagem aparece na obtenção de RFV elevados na detecção de anticorpos onde pode ocorrer de mascarar a resposta antigênica. A interpretação permanece válida para os anticorpos.
A mensagem “incorrect” invalida qualquer resultado.

13. Valores críticos

Não se aplica.

14. Especificações de desempenho

Segundo o fabricante:

a) Especificidade em amostras de doadores de sangue: 99,88%
b) Especificidade em amostras de doentes hospitalizados: 100%
c) Especificidade em amostras com comportamento de risco: 100%
d) Diluições com 3 amostras HIV 1 e 2 amostras HIV 2 do painel EFS 96 foram consideradas positivas sensibilidade determinada no painel Ag HIV SFTS (subtipo B) foi estudado em 11,5 pg/mL de Ag HIV-1.

Validação no laboratório: critério de aceitação = concordância de resultado em, pelo menos, 98% das amostras.
Resultado: 100% de concordância.

15. Fontes Potenciais de Variabilidade

Amostras visivelmente hemolisadas, lipêmicas ou ictéricas não se aconselha utilizar, evitar congelamentos e descongelamentos excessivos das amostras.
Plasma recalcificado pode dar origem a resultados falsamente positivos.
Não utilizar cones e barretes danificados e não misturar reagentes de lotes diferentes.

16. Limitações do Método

O VIDAS HIV DUO Ultra é um teste de triagem e não deve ser utilizado como teste específico de antígenos p24 do HIV-1.
A utilização de outros líquidos biológicos, como saliva, LCR e urina não foram validadas para esta metodologia.
Em casos de concentração elevada de antígeno p24 a resposta antigênica apresenta-se como ND (Não Determinada) e o sinal da resposta em anticorpos da interpretação final do teste apresenta-se como positiva.
É necessário confirmação dos testes do HIV DUO, pois podem ocorrer interferências de soros com anticorpos dirigidos contra os componentes dos reagentes.

17. Interpretação dos Resultados

Os valores próximos a 0,25 devem ser interpretados com prudência.
As amostras positivas devem ser confirmadas por técnicas confirmatórias como Western Blot ou IBR.

18. Biossegurança

Obedecer às normas de segurança vigentes no laboratório e usar equipamentos de proteção individual.

19. Anexos

Planilhas de controle interno (Anexo 24).

20. Bibliografia

Bula do teste, Manual MINI-VIDAS